

AUS DEM STRAHLENBIOLOGISCHEN
LABORATORIUM DER RADIOTHERAPEUTISCHEN
KLINIK DER UNIVERSITÄT ZÜRICH
(DIREKTOR: PROF. DR. H. R. SCHINZ)
ARBEIT UNTER LEITUNG VON P. D. DR. HEDI FRITZ-NIGGLI

DER EINFLUSS VON ULTRASCHALL
AUF DAS WACHSTUM DES
EHRLICH-CARCINOMS DER MAUS

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

VORGELEGT VON
JAN P. N. MIJNSSEN
VON SCHAFFHAUSEN

GENEHMIGT AUF ANTRAG VON PROF. DR. H. R. SCHINZ
UND VON P. D. DR. HEDI FRITZ-NIGGLI

ZÜRICH 1953
VERLAGSANSTALT BENZIGER & CO. AG. EINSIEDELN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM STRAHLENBIOLOGISCHEN
LABORATORIUM DER RADIOTHERAPEUTISCHEN
KLINIK DER UNIVERSITÄT ZÜRICH
(DIREKTOR: PROF. DR. H. R. SCHINZ)
ARBEIT UNTER LEITUNG VON P. D. DR. HEDI FRITZ-NIGGLI

DER EINFLUSS VON ULTRASCHALL
AUF DAS WACHSTUM DES
EHRlichCARCINOMS DER MAUS

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

VORGELEGT VON
JAN P. N. MIJNSSEN
VON SCHAFFHAUSEN

GENEHMIGT AUF ANTRAG VON PROF. DR. H. R. SCHINZ
UND VON P. D. DR. HEDI FRITZ-NIGGLI

ZÜRICH 1953
VERLAGSANSTALT BENZIGER & CO. AG. EINSIEDELN



Frau P. D. Dr. Hedi Fritz-Niggli danke ich herzlich für ihre wertvollen Ratschläge bei der Abfassung dieser Arbeit.

Auch Frl. J. Berger möchte ich an dieser Stelle danken für ihre Hilfe bei der Herstellung der Präparate.

Inhaltsverzeichnis

I. Problemstellung	7
II. Methodik	7
III. Dosierung des Ultraschalls	8
IV. Einfluß des Ultraschalls auf die Überlebensdauer der Ehrlich- Carcinom-Mäuse	10
V. Die Zellteilung nach Ultraschalleinwirkung	11
a) Versuchsanordnung	11
b) Mikroskopische Auswertung	12
c) Qualitative histologische und cytologische Auswirkungen des US.	12
d) Die Auszählungsergebnisse	15
e) Diskussion	20
aa) Vergleich mit Röntgenstrahlen	22
bb) Vergleich mit Ultraviolettstrahlen	23
VI. Schlußfolgerungen	24
VII. Zusammenfassung	25
VIII. Schrifttum	26
Curriculum vitae	27

I. Problemstellung

In der Literatur finden sich widersprechende Resultate über die Behandlung bösartiger Tumoren mit Ultraschall (US). Die ersten Versuche in dieser Richtung wurden in Japan an Tieren (Ratten, Hühner) durchgeführt und ergaben bei schwacher Dosierung Wachstumsanregung, bei starker dagegen Hemmung des Tumorwachstums (HAYASHI, KOBAYASHI, NAKAHARA, NAMIKAWA: zit. nach POHLMAN: 1951). HORVATH (1944) berichtete erstmals über gute Resultate nach Beschallung bösartiger Hauttumoren (Hautsarkome, Hautcarcinome) am Menschen. Diese guten Resultate ließen sich später jedoch nicht reproduzieren, sodaß die hochgestellten Erwartungen enttäuscht wurden. Vor allem in Deutschland wurde in der Folge tierexperimentell in dieser Richtung weitergearbeitet (HAUSSER, DOERR, FREI, UEBERLE: 1949; WOEBER: 1949; DITTMAR: 1948). Diese Autoren arbeiteten mit Impftumoren bei Ratten (Jensensarkom, Walkercarcinom) und erzielten in einem mehr oder weniger großen Prozentsatz Heilungen.

Wir versuchten in erster Linie, den Wachstumsvorgängen in einem mit US behandelten bösartigen Tumor durch Auszählung der Mitosen näherzukommen, und wählten als Versuchsobjekt das Ehrlichcarcinom der Maus.

Vorgängig den Hauptversuchen, in denen die Teilungsstadien ausgezählt wurden, stellten wir fest, 1. welche US-Dosen von den Mäusen ohne sichtbare Schädigung ertragen werden; 2. ob beim Ehrlich-Ca. eine Heilung zu erzielen ist mit diesen Dosen. Da es sich um einen verhältnismäßig rasch wachsenden Tumor handelt, der auch unbehandelt eine ansehnliche Mitoserate besitzt, war anzunehmen, daß diese im Fall einer Beeinflussung durch US besonders empfindlich reagieren werde.

II. Methodik

Wir wählten für unsere Versuche weiße, männliche Mäuse, im Alter von ca. 3 Monaten. Das Gewicht variierte zwischen 14 und 23 g. Als Impfmateriel diente feinzerriebener Tumorbrei. Diesen gewannen wir unter Wahrung der Asepsis von früher geimpften Mäusen, deren Tumoren nach Excision im Mörser fein zermahlen und mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurden. Von dieser Aufschwemmung wurde jedem Tier $\frac{1}{2}$ ccm unter die vorgängig mit Alkohol desinfizierte Haut zwischen Oberschenkel und Wirbelsäule injiziert. Nach 15 bis

20 Tagen waren die Tumoren für die Beschallung geeignet, wenn sie ca. Linsengröße erreicht hatten. Abscesse bildeten sich in keinem Fall. Bei ca. 80% der Mäuse gingen die Tumoren an.

Als Behandlungsgerät diente der «Ultravibrator» der Firma Dr. Lehfeldt & Co., Marquartstein, mit einem Schallkopfdurchmesser von 40 mm. Das Gerät arbeitet mit geglättetem Gleichstrom und erzeugt Intensitäten von ca. 0,4 bis 5 Watt/cm². Seine US-Frequenz beträgt 800 000 Hz. Es besitzt ein eingebautes, logarithmisch eingeteiltes Meßgerät, sodaß die Meßgenauigkeit mit abnehmender Intensität progressiv zunimmt. Das Meßgerät besitzt den Vorteil, nur die effektiv abgestrahlte Energie anzugeben. Es wurde vorgängig unseren Versuchen von R. Pohlman geeicht.

Die Beschallungen erfolgten in einem mit Wasser gefüllten Glasgefäß von 14 cm Durchmesser, da Luft bekanntlich für US praktisch undurchlässig ist. Das Wasser wurde zwecks Entgasung abgekocht. Hinter dem Beschallungsobjekt war eine ca. 2 cm dicke Glaswollschicht angebracht, welche die überflüssige US-Energie absorbierte und auf diese Weise Reflexion an der Gefäßwand vermied. Der Schallkopf wurde mittels Stativ so fixiert, daß seine Strahlung parallel zur Wasseroberfläche gerichtet war.

Die Mäuse wurden in Narkose beschallt. Da die Äthernarkose zu große Ausfälle ergab, wurde in der Folge Numal verwendet, indem den Tieren 0,03 ccm/g Körpergewicht einer 3‰igen Lösung (= 0,09 mg Numal pro g Körpergewicht) subcutan injiziert wurde. Die Tiere fielen auf diese Weise nach ca. ½ Stunde in Schlaf, der 4–8 Stunden andauerte. Dank dieser Methode hatten wir keine Narkoseausfälle mehr zu verzeichnen.

Die narkotisierten Tiere wurden mit der hinteren Körperhälfte, an welcher sich der Tumor zwischen Oberschenkel und Wirbelsäule befand, unter Wasser in den Schallstrahl verbracht. Einzelne Luftblasen im Fell wurden sorgfältig entfernt, um eine Reflexion zu vermeiden. Auf diese Weise befand sich der ganze Tumor im Schallfeld, doch wurden unvermeidlich ausgedehnte gesunde Körperpartien mitbeschallt. In Vorversuchen stellten wir deshalb die Dosen fest, welche von den Mäusen ohne Schaden ertragen werden.

III. Dosierung des Ultraschalls

Zur Festlegung der zulässigen Maximaldosis in unseren späteren Versuchen beschallten wir ungeimpfte Mäuse auf die oben beschriebene Weise, mit dem einzigen Unterschied, daß hier die Bauchseite exponiert wurde. Wir variierten

1. die Intensität
2. die Expositionsdauer
3. den Abstand zwischen Schallkopf und Objekt.

Die Resultate sind aus Tab. 1 ersichtlich. Es sind darin lediglich die kritischen Ergebnisse aufgeführt. Kürzere Beschallungszeiten und schwächere Intensitäten hatten keine Folgen. Einzig ein Gewichtsverlust von 1–2 g in den ersten 24 Stunden nach der Beschallung bei

Zahl Tiere	Zeit	Intensität	Abstand vom Schallkopf	Wirkung
1	5'	2,0 W/cm ²	3 cm	keine Schädigung
1	5'	3,55 »	3 »	keine Schädigung
1	5'	3,55 »	0 »	keine Schädigung
1	10'	1,25 »	3 »	keine Schädigung
1	9½'	1,25 »	0 »	Tod nach 9½' US, streckt Hinterbeine aus
1	10'	1,75 »	3 »	keine Schädigung
1	10'	1,75 »	0 »	Tod 5 Std. nach US
1	10'	2,5 »	3 »	Tod 4 Std. nach US
1	8½'	2,5 »	0 »	Tod nach 8½' US, streckt Hinterbeine aus
1	10'	4,3 »	3 »	Tod ½' nach US, streckt Hinterbeine aus
1	9½'	4,3 »	0 »	Tod nach 9½' US

Tab. 1: Grenzdosen bei Ultraschall der Maus

sämtlichen überlebenden Tieren wies auf eine Beeinflussung hin. Dieser Verlust wurde aber am folgenden Tage kompensiert. Die Mäuse wurden während 30 Tagen nach der Beschallung kontrolliert und wiesen in keinem Fall Spätschäden auf.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß das Gesetz Intensität × Zeit = Konstant, wie es z. B. in weitem Maße bei der Röntgenbestrahlung zutrifft, beim US nicht gilt, wie dies in der Literatur schon wiederholt erwähnt wurde. Vielmehr scheint die US-Wirkung, zumindest in unseren Versuchen, nach dem «Alles oder Nichts»-Gesetz zu verlaufen: Entweder wiesen die Tiere unmittelbar nach der Beschallung Schädigungen auf und gingen binnen Minuten oder Stunden daran zugrunde, oder sie überstanden den Eingriff ohne sichtbare Folgen.

Auffallend ist, daß selbst doppelt so große Intensitäten (3,55 W/cm²), als diejenigen, welche wir später zur Anwendung brachten, bei kurzer

Exposition (5 Minuten) ohne Folgen blieben. Bemerkenswert ist ferner, daß allein die Veränderung der Beschallungsdistanz um 3 cm im Grenzfall über Leben oder Tod des Tieres entschied. Offenbar genügt die bescheidene US-Absorption im dazwischenliegenden Wasser beim Abstand von 3 cm zwischen Schallkopf und Tier, um eine irreversible Schädigung zu vermeiden.

Auf Grund dieser Resultate entschlossen wir uns für eine Expositionsdauer von 10 Minuten und eine obere Intensitätsgrenze von $1,75 \text{ W/cm}^2$, sowie 3 cm Objekt Abstand bei sämtlichen späteren Beschallungen. Diese Dosierungsbegrenzung bewährte sich auch in größeren Serien, indem wir bei geeigneter Narkosetechnik keine Ausfälle verzeichneten.

IV. Einfluß des Ultraschalls auf die Überlebensdauer der Ehrlich-Carcinom-Mäuse

Nach Angaben in der Literatur war zu erwarten, daß sich auch das Ehrlichcarcinom der Maus durch US beeinflussen ließ. Obwohl wir die Tumoren im Frühstadium beschallten, gelang es in keinem Falle, eine

Zahl Tiere	Beschallungszeit	Intensität	Überlebensdauer Tage	Mittel Tage
6	10'	$1,75 \text{ W/cm}^2$	54, 44, 44, 33, 31, 23	38,2
4	10'	1,5 »	46, 46, 38, 31	40,3
4	10'	1,25 »	34, 34, 27, 26	30,3
1	$2 \times 10'$ in 24 Std.	1,5 »	37	37
			Gesamtmittel:	36,5
5	Kontrollen	.	54, 52, 48, 35, 34	44,6

Tab. 2: Überlebensdauer mit und ohne US

Heilung zu erzielen. Auch eine nur vorübergehende Verkleinerung wurde nie festgestellt. Die Beschallungsintensitäten lagen zwischen 1,25 und $1,75 \text{ W/cm}^2$. Abgesehen von einer Serie, welche zweimal, im Abstand von 24 Stunden, behandelt wurde, erhielten die Tiere eine Beschallung. Vergleichshalber blieb eine Serie unbeschallt. Die Überlebensdauer wurde vom Zeitpunkt an gerechnet, da der Tumor palpabel wurde (Stecknadelkopfgröße).

Alle Tiere starben an Kachexie, nachdem der Tumor Walnuß- bis Pflaumengröße erreicht hatte.

An obigen Resultaten ist auffallend, daß die mittlere Überlebensdauer der unbeschallten Kontrollen mit 44,6 Tagen deutlich länger ist als bei den beschallten Serien, wo ein Mittel von 36,5 Tagen erzielt wurde. Bei der statistischen Auswertung mit der sog. t-Methode liegen jedoch die beiden Werte noch innerhalb der Sicherheitsgrenze (bei einem Wahrscheinlichkeitsfaktor von 5% beträgt $t = 2,101$. Unser t errechneten wir mit 1,398), sodaß der Unterschied nicht als gesichert gelten kann. Es läßt sich deshalb nichts darüber aussagen, ob der US hier lebensverkürzend gewirkt hat.

Eines zeigen diese Versuche jedoch deutlich, daß in unserem, allerdings beschränkten Material mit diesen für die Maus an der Grenze des tragbaren liegenden US-Dosen weder eine Verkleinerung, noch eine Heilung des Ehrlichcarcinoms erzielbar war.

V. Die Zellteilung nach Ultraschalleinwirkung

a) Versuchsanordnung:

Um Einblick in die Teilungsvorgänge zu gewinnen, unterzogen wir unsere Mäuse serienweise Beschallungen unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen (3 cm Abstand vom Schallgeber, Objekt bewegt). Jedes Tier wurde während 10' exponiert. Wir hielten uns an dieselben Intensitäten, wie bei der Bestimmung der Überlebensdauer (je 1 Serie mit 1,75, 1,5, 1,25, $2 \times 1,5 \text{ W/cm}^2$). Jede Serie umfaßte 8 Tiere, die nach den unten beschriebenen Zeitabständen getötet wurden. Überdies behandelten wir eine gleichgroße Serie mit der schwachen Intensität von $0,5 \text{ W cm}^2$, um abzuklären, ob damit eine Anregung des Wachstums und eine Vergrößerung der Zellteilungsrate eintrete. In bestimmten Intervallen, die ersten sofort, die letzten 72 Stunden nach der Beschallung, wurden die Mäuse getötet und der Tumor herauspräpariert. Letzterer wurde sogleich in Bouin'scher Lösung fixiert zur histologischen Auswertung. Innerhalb der genannten Zeitspanne versuchten wir in erster Linie die Vorgänge zu erfassen, welche sich in den ersten 6 Stunden nach der Beschallung abspielen, da sie deren unmittelbare Wirkung widerspiegeln. Daher entnahmen wir die Tumoren nach 0, 1, 2, 3 und 6 Stunden. Nach weiteren 24, 48 und 72 Stunden wurde ebenfalls von jeder Serie 1 Tier getötet, um auch eventuelle Spätwirkungen zu erfassen.

Die Aufarbeitung der Schnitte geschah nach der üblichen histologischen Technik. Die Färbung erfolgte mit Hämalaun-Eosin.

b) Mikroskopische Auswertung:

Wir arbeiteten mit einem Zeiß-Mikroskop. Die cytologischen Untersuchungen erfolgten mit der Ölimmersion ($90\times$) und dem Okular $7\times$, bei einer Gesamtvergrößerung also von $630\times$. Der Durchmesser des Gesichtsfeldes betrug hierbei 200μ . In jedem Tumor wurden im Prinzip 40 Gesichtsfelder ausgezählt. Um gute Vergleichswerte zu erhalten, wurden nur gefäßarme, homogene, nekrosefreie Gebiete berücksichtigt, die in der Anzahl der Zellen pro Gesichtsfeld einander möglichst entsprachen. Die systematische Auszählung der Ruhekerne erwies sich als praktisch undurchführbar, da diese bei 8μ Schnittdicke teilweise übereinanderliegen. Wir beschränkten uns deshalb auf 10 Stichproben, um die Vergleichbarkeit der Felder untereinander zu gewährleisten. Um auch bei den Mitosen untereinander vergleichbare Werte zu erhalten, wurden nur jene Phasen berücksichtigt, welche deutlich sichtbare Chromosomen aufwiesen. Frühstadien der Prophase und Spätstadien der Telophase entgingen auf diese Weise der Zählung, beeinflussten jedoch das Ergebnis nicht, da immer nach dem gleichen Prinzip verfahren wurde. Ohne diese klare Grenzziehung wären keine zuverlässigen Vergleichswerte erzielbar gewesen. Stadien mit verklumpten Chromosomen, wie sie u. a. auch unter US-Wirkung entstehen können, wurden nicht mitgezählt, da sie oft nicht zu unterscheiden waren von Frühstadien mit undifferenziertem Chromatin, oder von pyknotischen Ruhekernen.

c) Qualitative histologische und cytologische Auswirkungen des US:

Die Tumoren wiesen bis 6 Stunden nach der Beschallung auf der dem Schallkopf gegenüberliegenden Seite eine dunkelrote Verfärbung auf und waren prall mit Blut gefüllt. Je kürzer die Beschallung zurücklag, desto ausgesprochener war dieses Bild. Auch die Beschallungsintensität, der die Tiere ausgesetzt waren, prägte dieses Merkmal mehr oder weniger stark aus. Bei den 24 Stunden und später nach Beschallung getöteten Mäusen blieb von diesen Veränderungen höchstens eine leicht bräunliche Verfärbung der Tumoroberfläche zurück.

Im histologischen Präparat stellten sich diese Veränderungen als starke Erweiterung der Gefäße, vor allem der Kapillaren heraus. Auch einzelne Gewebssrisse ließen sich finden, die mit hämorrhagischem Exsudat gefüllt waren. Häufig sahen wir auch Felder, in welchen die Gewebsspalten prall mit gelblichen zellfreien Massen – vermutlich Se-

rum – gefüllt waren, was auf eine oedematöse Schwellung schließen ließ. Diese Veränderungen waren offensichtlich auf die Beschallung zurückzuführen und stimmten überein mit den von GRÜTZ (1949) gemachten Beobachtungen nach Beschallung des Walkercarcinoms der Ratte.

Abgesehen von diesen Bildern waren die Tumoren durchwegs in mehr oder weniger großen Partien nekrotisch. Im Frischpräparat traten diese Gebiete als breiige Massen in Erscheinung. Diese Veränderungen fanden sich jedoch in demselben Ausmaß bei den nicht beschallten Kontrollen, so daß sie kaum auf die US-Behandlung zurückzuführen sind.

Einzig Tumoren, welche Stecknadelkopfgroße nicht überschritten, blieben von diesen Veränderungen im allgemeinen verschont. Als Ursache dieser ausgedehnten Nekrosen vermuten wir ungenügende Vascularisierung, die mit dem schnellen Tumorwachstum nicht Schritt halten kann. Dafür spricht auch die häufige Beobachtung ausgedehnter nekrobiotischer Bezirke – wir verstehen darunter Regionen, in welchen die Zellstruktur noch erkennbar ist, die Chromatinmassen jedoch bereits tropfenförmig verklumpt sind –, in denen nur noch ringförmig um die Gefäße gelagerte Zonen normale Zellstruktur und Teilungsphasen erkennen ließen. Einen spezifisch auf US zurückführbaren Gewebsuntergang konnten wir jedoch nirgends mit Sicherheit feststellen.

An den Mitosen beobachteten wir dagegen Abweichungen, obwohl sie in eindeutiger Ausprägung nur sporadisch auftraten. Zweifelsfälle wurden nicht berücksichtigt. In Tab. 3 sind diese Abweichungen zusammengefaßt.

Intensität	Zeit nach US	Teilungsphase	Effekt	Bild Nr.
$2 \times 1,5 \text{ W/cm}^2$ in 24 Std.	sofort	Anaphase	Aus Verband gerissenes Chromosomenpaket und Einzelchromosom	1
$2 \times 1,5 \text{ W/cm}^2$ in 24 Std.	1 Std.	Anaphase	Zwischen Polen liegengeblieb. Chromosom	2
$1,25 \text{ W/cm}^2$	2 Std.	Telophase	Quer über neuer Zellgrenze liegendes Chromosomenpaket	3
$1,75 \text{ W/cm}^2$	48 Std.	Telophase	Chromosomenpaket in falscher Tochterzelle eingeschlossen	4
$0,5 \text{ W/cm}^2$	48 Std.	Anaphase	Brückenbildung	5

Tab. 3: US-Effekte auf Teilungsphasen

Bei den in Abbildung 1 und 2 sichtbaren Mitosen kann nicht sicher entschieden werden, ob sie schon bei der ersten Beschallung so geschädigt wurden, daß der Teilungsablauf gehemmt wurde, oder ob die Schädigung durch die zweite Behandlung auftrat. Letzteres ist jedoch wahrscheinlicher, da die Zellen keine Pyknose zeigen. In Abbildung 3 ist eine Telophase sichtbar, in welcher 2 Stunden nach US ein Chromosomenpaket quer über der neuen Zellgrenze liegt. Entweder wurde diese Gruppe in einer früheren Teilungsphase losgerissen, wobei sich der Teilungsvorgang bis in die Telophase fortsetzte, oder die Veränderung trat in der Telophase selbst ein und hemmte den weiteren Teilungsablauf. In Bild 4 ist eine Telophase sichtbar, deren eine Tochterzelle ein Chromosomenpaket der anderen beherbergt. Die Chromosomen sind nicht sehr deutlich voneinander zu unterscheiden und scheinen etwas verklumpt. Es ist anzunehmen, daß diese Mitose in einer früheren Phase geschädigt wurde, sich jedoch bis zur Telophase entwickeln konnte, und dann zugrunde ging. Bei der in Abbildung 5 dargestellten «Brückenbildung» einer Anaphase dürfte eine kurz vor der Teilung erfolgte US-Schädigung manifest geworden sein. Daß die Schädigung an der bereits in Teilung begriffenen Zelle erfolgte, ist hier, 48 Stunden nach der Beschallung, nicht anzunehmen. Es ist denkbar, daß der US hier eine den Röntgenstrahlen ähnliche Wirkung ausübte, indem chemische Umsetzungen und Beeinflussungen der Kernenzyme stattfanden, die zu einer Verklebung führten, oder Fragmentation und nachfolgende Rekombination (s. später). Bei den anderen Bildern scheint uns die Interpretation als mechanischer US-Effekt jedoch plausibler, obwohl ähnliche Veränderungen auch mit Röntgenstrahlen erzielbar sind.

Daß diese Mitoseschädigungen nicht regelmäßig vorkamen, könnte damit erklärt werden, daß bei der Beschallung am bewegten Objekt, bzw. mit bewegtem Schallgeber, das Zusammentreffen verschiedener Bedingungen nötig ist, um den Chromosomenverband zu sprengen; z. B. daß eine in Mitose befindliche Zelle mehrmals kurz hintereinander in die maximale Amplitude eines Schwingungsbauches gerät. Denn auch bei der sog. streichenden Beschallungsweise werden einzelne Zellen mehr «geschüttelt», andere weniger, eine völlig homogene Verteilung läßt sich auch mit dieser Methode nicht erreichen. Ob bei einer weiteren Erhöhung der Intensität, bzw. der Beschallungsdauer, eine Zunahme dieser abnormen Bilder eintritt, konnten wir nicht feststellen. WOEBER (1951) berichtet jedoch anhand von Untersuchungen am Walker-Ca. der Ratte über eine Steigerung der pathologischen Teilungsfiguren bei Zunahme der Intensität.

Bei den im Ruhezustand befindlichen Zellen konnten wir keine morphologischen Veränderungen wahrnehmen, die auf eine spezi-

fische US-Schädigung hinwiesen. Ausgedehnte Nekrosen und Pykosen waren auch in Kontrolltumoren vorhanden. Dies berührt die von anderen Autoren beschriebenen Kern- und Zellerreißungen nicht, da diese an anderem Untersuchungsmaterial, sowie mit anderen Intensitäten und Beschallungszeiten erfolgten (WOEBER; ASCHE: 1951).

d) Die Auszählungsergebnisse:

Wie erwähnt, wurden im Prinzip in jedem Tumor 40 Gesichtsfelder ausgezählt. Sofern die Zwischenresultate nach je 20 Feldern um mehr als 20%, differierten, wurden nochmals 40 Felder ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Für jede Untersuchung stand uns ein Tumor zur Verfügung mit Ausnahme von 3 Fällen, wo wir deren zwei besaßen.

Die Ergebnisse variierten zwischen 41 und 102 Teilungsphasen in allen 40 Gesichtsfeldern zusammen bei den beschallten Tumoren. Das Mittel aus sämtlichen 43 Resultaten lag bei 83,6 Mitosen. Demgegenüber betrugen die Werte der beiden unbeschallten Kontrolltumoren 99, bzw. 103 Mitosen in 40 Gesichtsfeldern, Mittel also 101, oder, verglichen mit den Ruhekernen, 8,3‰.

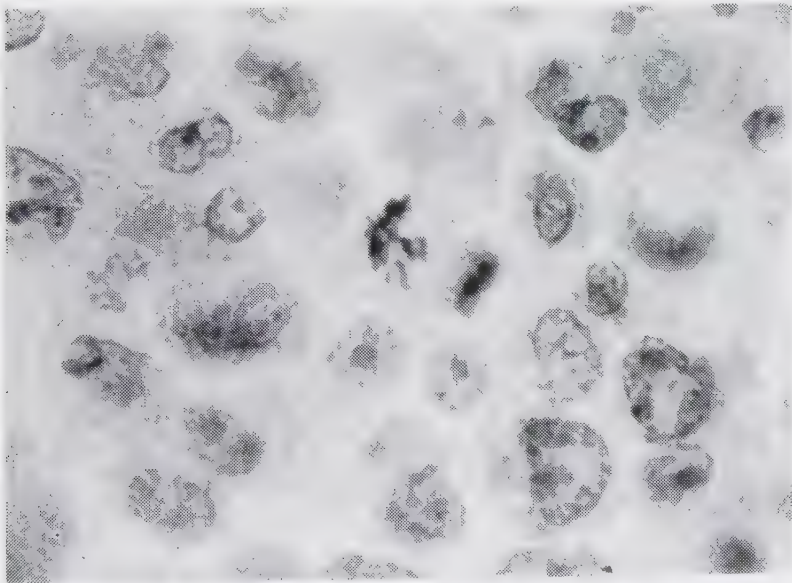


Abb. 1: Anaphase, aus Verband gerissenes Chromosomenpaket und Einzelchromosom. Vergr. 1600×

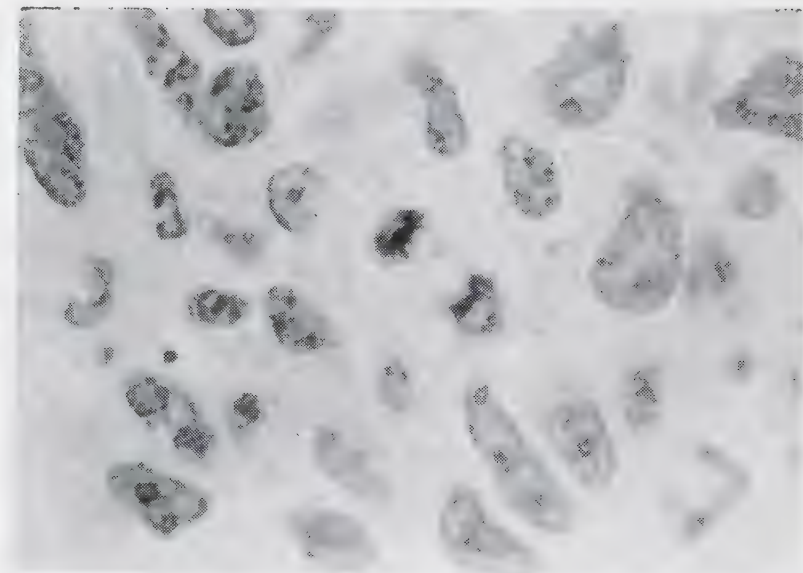


Abb. 2: Anaphase, zwischen Polen liegende Chromosom. Vergr. 1600 $\times$

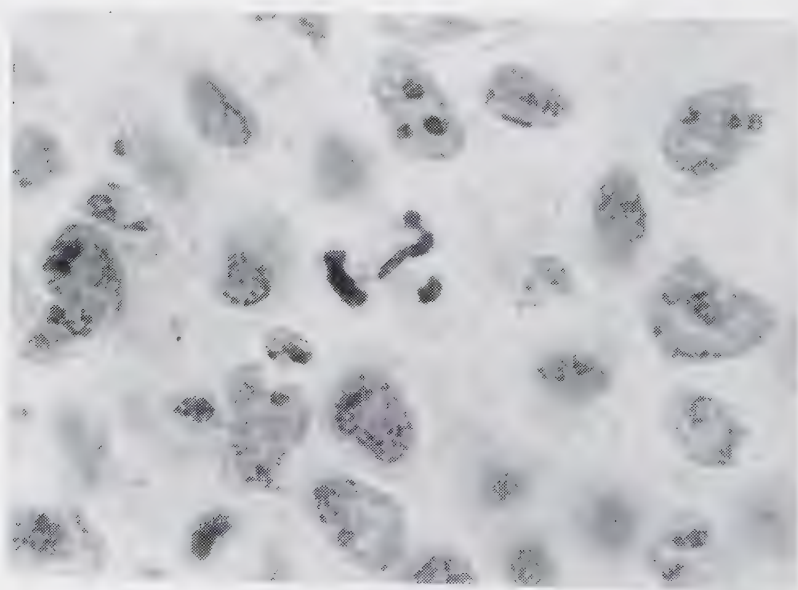


Abb. 3: Telophase, quer über neuer Zellgrenze liegendes Chromosomenpaket.
Vergr. 1600 $\times$

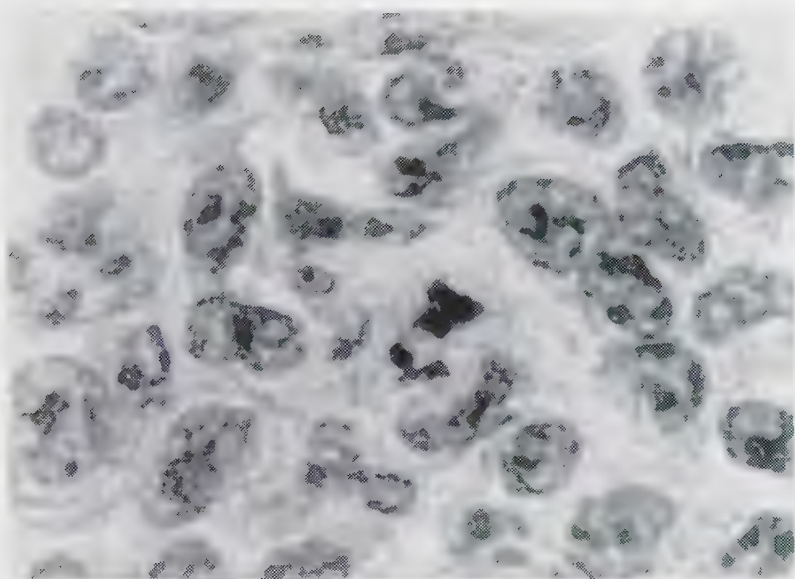


Abb. 4: Telophase, Chromosomenpaket in falscher Tochterzelle eingeschlossen.
Vergr. 1600×

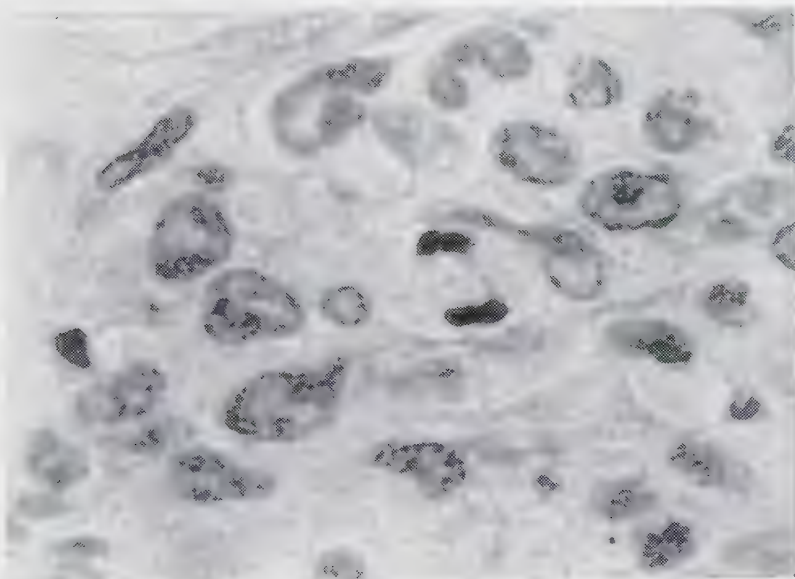


Abb. 5: Anaphase, Brückenbildung. Vergr. 1600×

Bei der Auszählung wurden auch die verschiedenen Teilungsphasen differenziert. Die oben erwähnten Ergebnisse stellen die Summe aus den 4 Phasen dar. Im Mittel wurden pro Gesichtsfeld 2,1 Teilungsphasen beobachtet. Bei einer mittleren Zellzahl von 295,7 pro Gesichtsfeld (Mittel aus 10 Werten, Minimum 269, Maximum 323 Zellen), ergibt dies 7,1‰ oder eine Mitose auf 138,3 Zellen.

Zeit der Tumorentnahme nach US	Sof.	1 h	2 h	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
0,5 W/cm ²	71	55	61	87	75	67	93	78
1,25 »	111 92	95	95 78	95	97	93	72 69	78
1,5 »	67	82	87	80	83	87	94	90
1,75 »	98	86	96	93	85	82	89	73
2 × 1,5 »	41	100	70	97	94	93	96	81
Kontrollen: 103 99								

Tab. 4: Mitosenzahl in 40 Gesichtsfeldern (je 1 Tumor)

Die 4 Teilungsstadien waren in jedem Tumor vertreten, wenn auch die prozentuale Zusammensetzung Schwankungen unterworfen war, die scheinbar keiner Regel folgten. Wir verzichten deshalb auf eine detaillierte Wiedergabe.

In Abbildung 6 sind die Resultate von Tab. 4 in Kurvenform dargestellt. Bei deren Studium fällt auf, daß von den 43 ausgezählten Werten lediglich einer das Kontrollmittel überschreitet (der Unterschied von 1‰ liegt zudem noch innerhalb der Fehlergrenze), alle anderen aber mehr oder weniger unter dem Durchschnitt liegen. Im Mittel aus sämtlichen Auszählungswerten zeigt sich eine durchschnittliche Verminderung der Mitosen um rund 16‰ gegenüber den unbeschallten Kontrollen.

Die auf die einzelnen Zeitabschnitte bezogenen Mittelwerte (in Abbildung 6 senkrecht übereinander), und diejenigen der einzelnen Serien (Mittel aus den einzelnen Kurven) fassen wir in Tab. 5, bzw. Tab. 6 zusammen.

Zeit nach US	Sof.	1 h	2 h	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
Mittelwert der Mitosenzahl in den einzelnen Zeitabschnitten	75,8	83,6	80,2	90,4	86,8	84,4	88,6	80,0

Tab. 5: Mittelwerte in einzelnen Zeitabschnitten



Abb. 6: Graphische Darstellung der in Tab. 4 verzeichneten Werte (1-2 Tiere pro Versuch)

Beschallungs- intensität	0,5 W/cm ²	1,25 W/cm ²	1,5 W/cm ²	2 × 1,5 W/cm ²	1,75 W/cm ²
Mittlere Mitosen- zahl bei gleichen Dosen	73,4	89,8	83,8	84,0	87,8

Tab. 6: Mittelwerte bei gleichen US-Dosen (Serienmittel)

e) Diskussion:

Beim Vergleich der einzelnen Kurven untereinander fällt einem auf, wie wenig Ähnlichkeit sie besitzen. Das planmäßige Vorgehen bei der Beschallung spiegeln sie in keiner Weise wider. Dieser Umstand läßt sich wenigstens teilweise damit erklären, daß die Mitosehäufigkeit pro Gesichtsfeld auch in vitalen Gewebepartien stark variiert. Jedenfalls ist dies nicht auf eine unterschiedliche Beschallung verschiedener Regionen zurückzuführen, da wir dieselbe Beobachtung bei den Kontrolltumoren machten. Wir vermuten, daß dies mit einer unterschiedlichen Blutversorgung zusammenhängt, da diese bei dem schnellen Tumorstadium keineswegs immer sichergestellt ist, was auch die ausgedehnten Nekroseherde verraten. Ähnliche Beobachtungen machte auch LUTHER (1940). Als erstes Symptom mangelhafter Durchblutung scheint eine Abnahme der Mitosefähigkeit einzutreten, wobei aber die Ruherkerne noch keine morphologischen Abweichungen zeigen.

Wir müssen folglich mit einer ziemlich großen Fehlerbreite rechnen. Dadurch verliert zwar das Einzelresultat an Bedeutung, wogegen die Durchschnittswerte um so wichtiger werden. Offenbar reichten auch die Unterschiede in der Beschallungsintensität nicht aus, um in unserem Behandlungsgut eindeutig verschiedene Ergebnisse zu erzielen.

Bei der Betrachtung der Mittelwerte nach einzelnen Zeitabschnitten (Tab. 5) finden sich die tiefsten Werte (75,8 Mitosen) sofort nach der Beschallung. Die Beeinflussung der Zellteilungsrate scheint zu diesem Zeitpunkt am größten zu sein innerhalb des von uns kontrollierten Zeitraumes. Andererseits kommen die Werte nach 3 bzw. 48 Stunden den Kontrollen am nächsten (90,4 bzw. 88,6 Teilungen). Doch auch anhand dieser Mittelwerte läßt sich keine zwingende Regel bezüglich der Häufigkeit der Teilungsphasen aufstellen.

Da wir unsere Untersuchungen 72 Stunden nach der Beschallung abbrechen, und die durchschnittliche Mitosezahl bis dahin noch deutlich unter dem Kontrollmittel lag, wissen wir nicht, ob sich die Teilungstätigkeit schlußendlich normalisierte. Wenn wir jedoch berücksichtigen,

daß die Tumoren der auf die Überlebensdauer geprüften Mäuse keine merkliche Verminderung des Wachstums zeigten, dürfen wir annehmen, daß dies der Fall war.

Die Mittel aus den einzelnen Serien ergeben das überraschende Resultat, daß die mit $0,5 \text{ W/cm}^2$ behandelten Tumoren weitaus den tiefsten Wert aufweisen (73,4 Mitosen). Damit ist die Frage, ob bei dieser schwachen Intensität eine Anregung der Teilungstätigkeit eintrete, negativ beantwortet. Es stellt sich im Gegenteil die Frage, ob die Teilungstätigkeit auf diese Intensität besonders empfindlich reagiert. Interessant ist ferner, daß die einmal und zweimal mit $1,5 \text{ W/cm}^2$ beschallten Tumoren mit 83,8 bzw. 84,0 Teilungen praktisch denselben Mittelwert aufweisen, wenn auch der Kurvenverlauf nicht derselbe ist. Daraus läßt sich schließen, daß im Ganzen gesehen die Teilungstätigkeit durch die erste Beschallung keine grundlegende Umstimmung erfuhr. Aber auch aus diesen Serienmittelwerten gelingt es uns nicht, eine Regel herauszukristallisieren.

Versuchen wir nun, die Senkung der Zellteilungsarten in den von uns erfaßten Zeitabschnitten zu erklären.

Der US besitzt verschiedene Wirkungskomponenten, die je nach Umständen mehr oder weniger in Erscheinung treten. Es sind die

- a) mechanische
- b) thermische
- c) chemische

Komponente.

Mechanisch wirkt sich der US vor allem an Grenzflächen von Medien verschiedener Dichte aus, da die Beschleunigung der einzelnen Teilchen kurzzeitig sehr hohe Werte erreicht (ca. 100000fache Erdbeschleunigung) dank der hohen Frequenzen. Als Grenzfläche wirkt z. B. das Periost gegenüber dem umgebenden Bindegewebe. Aber auch in viel kleinerem Maßstab, wie der Zell- und Kernmembran und den Chromosomen bei den in Teilung begriffenen Zellen scheinen sich die Dichteunterschiede auszuwirken, was zu Zerreißen mit Cytoplasmaaustritt und Fragmentation von Chromosomen führen kann. Auch in unserem Material fanden sich, wie erwähnt, Zerreißen und Desorganisation von Teilungsphasen. Hierbei handelte es sich meist um Abtrennung von Chromosomengruppen, oder Einzelchromosomen, dagegen wurde die Fragmentierung von Chromosomen selten beobachtet.

Die thermische Wirkung ist die Folge der Absorption von US im durchschallten Medium. Im durchbluteten Gewebe wird diese Wärme zum Großteil mit dem Blut abgeführt, ca. $\frac{1}{5}$ geht durch Wärmestrahlung verloren (POHLMAN: 1951).

Die starke Dilatation der Kapillaren und die Stase im Tumor, die wir innerhalb 6 Stunden nach der Beschallung beobachteten, dürfte auf diese Wärmezufuhr zurückzuführen sein. Es ist durchaus möglich, daß demzufolge die Ernährung der empfindlichen Tumorzellen zeitweilig gestört wurde, was sich auch in einer Verlangsamung der Teilungsvorbereitungen im Ruhekern und des Teilungsablaufes selbst auswirken und eine vorübergehende Senkung der Mitoserate bewirken konnte.

Der chemische Effekt dürfte in engem Zusammenhang mit dem Auftreten der Kavitation stehen. Es handelt sich dabei um kleinste Bläschen, die unter der Zugwirkung der US-Wellen entstehen und deren Wandungen elektrisch geladen sind. In homogenen Flüssigkeiten, z. B. Wasser, kann eine starke Ionisation nachgewiesen werden mit Bildung von freien Radikalen, ähnlich wie bei Röntgenbestrahlung, was chemische Umsetzungen zur Folge haben kann, wie die Bildung von H_2O_2 , HNO_2 usw. Zwar ist lebendes Gewebe ein zu inhomogenes Medium, um chemische Beeinflussungen ohne Schwierigkeit zu erforschen. Es darf aber angenommen werden, daß auch hier freie Radikale und Oxydationsprodukte auftreten unter US-Wirkung, die, wenn in genügender Konzentration vorhanden, den Zell- und Kernstoffwechsel über die Enzymsysteme tiefgehend zu beeinflussen vermögen. Damit besteht die Möglichkeit, daß die oben beschriebenen Abweichungen in der Chromosomenanordnung und eventuelle Fragmentationen nicht durch mechanische, sondern durch chemische Einflüsse verursacht wurden, ähnlich der Wirkungsweise von Röntgenstrahlen. In anderen Versuchen (Vergleich der Wirkung von Bestrahlung und Beschallung von *Drosophila melanogaster*) wurden bereits Parallelen gefunden zwischen US und Röntgenstrahlungswirkung (FRITZ: 1951), indem beide Behandlungen ähnliche Defekte in der Körperwand der behandelten Fliegen ergaben.

aa) Vergleich mit Röntgenstrahlen:

LUTHER (1940; 1943) hat sich in verschiedenen Arbeiten mit der Beeinflussung der Mitosehäufigkeit u. a. beim Ehrlich-Ca. der Maus nach Röntgenbestrahlung befaßt. Uns interessieren vor allem seine Resultate nach einseitiger Bestrahlung, die er mit 1000, 4000, 5000 und 11000 r durchführte. Er erzielte hierbei sofort nach der Bestrahlung einen starken Mitosesturz, der nach 21 bis 24 Stunden, unabhängig von der Dosis, das Minimum erreichte, nämlich ca. 10% des Normalmittels. 36 Stunden nach der Bestrahlung wurde ein Maximum an Teilungsphasen erreicht, das 35% über dem Mittel der Kontrollen lag. Dabei

handelte es sich jedoch größtenteils um pathologische Teilungen, die das Stadium der Metaphase offenbar nicht zu überschreiten imstande waren und sich darum anhäufte. Ganz vereinzelt traten unveränderte Telophasen auf, aus denen vermutlich das nachfolgende Rezidiv entstand. 5 bis 7 Tage nach der Behandlung erreichten die Mitosen neuerlich ein Minimum, da offenbar die pathologischen Teilungen bis dahin resorbiert waren. Eine «sterilisierende» Wirkung auf das Tumorgewebe ließ sich auch mit hohen Dosen nicht erzielen, indem immer einzelne intakte Telophasen auftauchten. In den ersten 10 Tagen nach der Bestrahlung trat ein Wachstumsstillstand der Tumoren ein. Danach begann das Rezidiv, sofern der Tumor nicht geheilt war bis zu diesem Zeitpunkt, was in einem bescheidenen Prozentsatz erreicht wurde.

Eine andere Arbeit von CARLSON (1950) berichtet über die Mitose-tätigkeit von Heuschreckenneuroblasten in Gewebekultur nach Röntgenbestrahlung. Nach diesem Autor gingen die Zellteilungen nach Bestrahlung weiter, sofern die entsprechenden Phasen zur Zeit der Behandlung einen kritischen Punkt, der in der späten Prophase lag, überschritten hatten. War dies noch nicht geschehen, dann setzte sich die Teilung fort bis zu diesem Punkt, und blieb dort eine bestimmte, von der Dosis abhängige Zeit stehen, bis sich die Zelle erholt hatte. Bei Dosen über 64 r setzte sogar eine Rückentwicklung in ein früheres Stadium ein, und erst wenn sich die Zelle wiederum erholt hatte, setzte sie die Teilung fort. Während einer von der Strahlungsdosis abhängigen Zeit waren somit keine Teilungsphasen zu finden, die den genannten kritischen Punkt überschritten hatten, sondern höchstens frühe Prophasen. Carlson fand folglich Teilungskurven, die nach der Bestrahlung auf Null sanken, nach Ablauf der Erholungsphase dagegen stark über das Normalmittel anstiegen, so daß der vorübergehende Teilungsstillstand im Gesamtergebn wieder wettgemacht wurde. Carlson arbeitete mit anderem Material und kleineren Dosen als Luther. Immerhin beobachtete auch jener bei hohen Dosen (8000 r) verklumpte Mitosen, die jedoch, wenn auch mit Verzögerung, zu Ende geführt wurden.

bb) Vergleich mit Ultraviolettstrahlen:

Carlson bestrahlte in ähnlicher Weise Heuschreckenneuroblasten in Gewebekultur mit UV. Damit erreichte er eine lineare Senkung der Mitosehäufigkeit bis 24 Stunden nach der Bestrahlung, dann wurden die Untersuchungen abgebrochen. Er beobachtete Störungen im Mitoseablauf, die er auf Beeinflussung des Spindelapparates zurückführte. Er

betrachtete den Ruhekern als das auf UV empfindlichste Stadium, was er mit der Absorption der verwendeten UV-Wellenlänge durch Nucleinsäuren in Zusammenhang bringt. Die Röntgenstrahlen beeinflussen dagegen nach seinen Angaben vor allem die Teilungsstadien. Er vermutet, daß sowohl Röntgenstrahlen, wie UV ihre Wirksamkeit durch Beeinflussung von Plasmaenzymen entfalten.

Wie wir gesehen haben, kann der US eine den oben genannten Strahlungsarten ähnliche Wirkungskomponente aufweisen, durch die chemische Beeinflussung der Lebensvorgänge in den Zellen. Je nach Ausprägung dieser Komponente ist es denkbar, daß sich der US-Effekt der einen oder anderen dieser Strahlungsarten annähert.

In unserem Material glauben wir jedoch die Hauptwirkung 1. der Störung des Zellstoffwechsels infolge mangelhafter Durchblutung, und 2. der Beeinflussung der in Teilung befindlichen Zellen durch mechanische US-Kräfte zuschreiben zu müssen. Es besteht aber sehr wohl die Möglichkeit, daß überdies eine chemische Einwirkung auf das intrazelluläre Enzymsystem durch die Bildung von Zwischenprodukten die Senkung der Zellteilungsraten und die abnormen Teilungsbilder mitbeeinflußte.

VI. Schlußfolgerungen

Die oben beschriebenen Resultate, kombiniert mit den Überlebenszeiten der beschallten Tumormäuse, lassen den Schluß zu, daß dieser Tumor mit unseren Beschallungsmethoden nicht entscheidend geschädigt werden kann. Infolge der Kleinheit der Tumorträger waren uns relativ enge Grenzen gezogen bei der Dosierung des US. Andere Autoren erzielten jedoch Heilungen an ähnlichen Impftumoren, vor allem dem Jensensarkom der Ratte, mit Dosen, die im allgemeinen kleiner waren, als die von uns verwendeten. Die verschiedene Größe von Ratte und Maus spielt hierbei nach unserem Dafürhalten eine nebensächliche Rolle, solange die Toleranzdosis für das ganze Tier nicht überschritten wird. Es scheint also, daß das Ehrlichcarcinom resistenter gegenüber Beschallung ist, als der oben erwähnte Tumor. Es wäre abzuklären, ob mit der neuerdings praktisch verwertbaren Focussierung des Schallstrahls im Tumor eine Heilung erzielt werden könnte.

Ungeklärt bleibt die Frage, weshalb die mit $0,5 \text{ W cm}^2$ behandelte Serie die größte Herabsetzung der Mitoserate aufwies.

Schlußendlich müssen wir zur Frage Stellung nehmen, ob wir durch die Beobachtung der Zellteilungsraten den Wachstumsvorgängen in

einem Tumor näherkommen. Wir schicken voraus, daß die Tendenz zu Spontannekrosen in dem von uns untersuchten Tumor und die äußerst unterschiedliche Verteilung der Teilungsraten in verschiedenen Regionen die Beurteilung der Resultate erschwerte. Es scheint uns aber plausibel, daß die Wachstumsgeschwindigkeit eines bösartigen Tumors durch eine mittlere Senkung der Zellteilungsrate um 16%, die sich zudem vermutlich wieder normalisiert, keine in Betracht fallende Einbuße erleidet, so daß die Resultate, welche wir bei der Bestimmung der Überlebensdauer erzielten, darin ihre Erklärung finden.

VII. Zusammenfassung

Das Ehrlichcarcinom der Maus wurde auf seine Empfindlichkeit gegenüber US geprüft durch

1. Kontrolle der Überlebensdauer beschallter Tiere,
2. Auszählung der Mitoseraten der Tumoren im Zeitraum von 0 bis 72 Stunden nach Beschallung.

Die Intensitäten bewegten sich zwischen 0,5 und 1,75 W/cm², bei 10minütiger Expositionsdauer. Die bei Mäusen anwendbare Maximaldosis wurde in speziellen Versuchen abgetastet.

Es gelang in keinem Fall, einen Rückgang des Tumorwachstums oder eine Heilung zu erzielen. Die Überlebensdauer beschallter Mäuse war eher kürzer als diejenige der unbehandelten Tiere.

An den Mitosen traten einzelne US-bedingte morphologische Abweichungen auf.

Die Zellteilungsraten lagen durchschnittlich 16% unter dem Kontrollmittel. Den Tiefpunkt erreichten sie mit 24% direkt nach der Beschallung. Diese Senkung wurde teils auf die Desorganisation der in Teilung befindlichen Zellen durch mechanische US-Kräfte zurückgeführt, teils einer durch Stase bedingten Durchblutungsstörung zugeschrieben. Eine Beeinflussung des Enzymsystems durch Auftreten von Radikalen infolge Kavitationseffektes wurde als Möglichkeit erwogen.

Das Ehrlich-Ca. scheint gegenüber US resistenter zu sein als andere, ähnliche Impftumoren.

VIII. Schrifttum

Asche, G.: Strahlenther. 85 (1951): 215 – Carlson, J. G.: J. Cell. and Comp. Physiol. 35 (1950): 89 – Dittmar, C.: Strahlenther. 78 (1948): 2, 217 – Fritz, H.: Strahlenther. 79 (1951): 233 – Grütz, O.: Strahlenther. 79 (1949): 577 – Hausser, I., Doerr, W., Frei, R., Ueberle, A.: Z. Krebsforschung 56 (1949): 449 – Horvath, J.: Strahlenther. 75 (1944): 119 – Luther, W.: Strahlenther. 68 (1940): 669; Strahlenther. 73 (1943): 671 – Pohlman, R.: Die US-Therapie (1951): 100 – Woeber, K. H.: Strahlenther. 79 (1949): 563; Strahlenther. 85 (1951): 207.

Curriculum vitae

Ich wurde am 23. April 1924 in Schaffhausen geboren und verbrachte meine Jugendzeit in dieser Stadt.

Nach dem Besuche der Primar-, Real- und Kantonschule bestand ich im Herbst 1943 die Maturitätsprüfung. Im selben Jahre begann ich mein Medizinstudium an der Universität Zürich. Nach dreijährigem Aufenthalt dasselbst siedelte ich nach Genf über und besuchte an der dortigen Universität zwei klinische Semester. Nach Zürich zurückgekehrt, beendete ich nach weiteren 4 Semestern meine Studienzeit mit dem eidg. Staatsexamen (Herbst 1949).

Nach Absolvierung der Offiziersschule im Frühling 1950 war ich an der internen Abteilung des «Diaconessenhuis Bronovo» in Den Haag als Assistent tätig, bis ich im Juli 1951 zum Militärdienst in die Schweiz zurückkehren mußte.



